

20020695

厚生科学研究費補助金  
特定疾患対策研究事業

## 自己免疫疾患に関する調査研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者 小 池 隆 夫

—目次—

(1)	構成員名簿	5
(2)	総括研究報告書	9
	自己免疫疾患に関する調査研究	
	小池 隆夫	11
(3)	分担研究報告書	19
1.	HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25+CD4+ T 細胞の機能異常に関する研究	
	石津 明洋	21
2.	PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症に関する研究	
	篠原 隆司	25
3.	免疫バランスの自己免疫病における意義	
	西村 孝司	28
4.	C1q 遺伝子多型が C1q 産生ならびにループス腎炎におよぼす影響	
	広瀬 幸子	33
5.	CD25+CD4+T 細胞による CD4+T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析	
	三村 俊英	38
6.	全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究	
	竹内 勤	43
7.	クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究	
	松下 祥	46
8.	全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究	
	鏑田 武志	53
9.	Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の 140kDa 蛋白を認識する自己抗体に関する研究	
	平形 道人	55

10. IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発に関する研究 西本 憲弘	63
11. 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討 宮坂 信之	71
12. シェーグレン 症候群唾液腺上皮細胞死における Fas および CD40 の役割 菅井 進	77
13. シェーグレン 症候群の発症および進展機序に関する研究 江口 勝美	85
14. 抗リン脂質抗体症候群の診断法：酸化 LDL、 $\beta$ 2-グリコプロテイン I 複合体 （自己抗原）とそれらの免疫複合体の測定意義 松浦 栄次	93
15. 抗リン脂質抗体産生を誘導する $\beta$ 2-グリコプロテイン I 分子修飾に関する研究 桑名 正隆	98
16. 抗リン脂質抗体症候群に対する rituximab(リツキサンの有用性に関する研究 山崎 雅英	102
17. 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトロンビン抗体の測定意義について 小池 隆夫	108
18. SLE をはじめとするリウマチ性疾患 感受性遺伝子に関する研究 徳永 勝士	112
19. 実験的自己免疫性筋炎(EAM)の作製と免疫学的解析に関する研究 原 まさ子	119
20. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御に関する研究 田中 良哉	122
21. 膠原病における IL-15 の検討：難治性病態との関連 橋本 博史	126
22. 臓器障害性抗 DNA 抗体の惹起因子の研究 佐々木 毅	131

23. 全身性自己免疫疾患における自己抗体の網羅的検索に関する研究 加藤 智啓.....	135
24. スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究 養田 清次.....	137
(4) 研究成果の刊行に関する一覧.....	139

(1) 構成員名簿

平成14年度 構成員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態内科学分野	教授
分担協力者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第二内科	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウィルス・免疫疾患研究部門免疫疾患分野	教授
	西本 憲弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助教授
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部病理学第二講座	助教授
	松下 祥	埼玉医科大学免疫学講座	教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答学系生体応答学講座生体応答調節学分野	教授
	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻 病態解析講座 分子病理学分野	助手
	江口 勝美	長崎大学医学部附属病院第一内科学教室	教授
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門分子免疫研究室	助教授
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部先端医科学研究所	講師
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病態制御学講座免疫・血液病制御学分野	教授
	篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構	助教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫内科学	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学教室	教授
	徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	教授
	西村 孝司	北海道大学遺伝子病制御研究所疾患制御部門・免疫制御分野	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部膠原病内科学講座	教授
	原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
	松浦 栄次	岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座細胞化学分野	助教授
簗田 清次	自治医科大学アレルギー膠原病学	教授	
三村 俊英	埼玉医科大学リウマチ膠原病科	助教授	
山崎 雅英	金沢大学医学部附属病院内科	助手	
事務局	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 706-5915 FAX (011) 706-7710	講師

(2) 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
総括研究者報告書

自己免疫疾患に関する調査研究

主任研究者 小池 隆夫  
(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座)

**研究要旨**

本研究では以下の項目を分担研究として行った。

①SLE における T 細胞-B 細胞相互関係の解析。②SLE および膠原病間質性肺炎に対する新たな治療法の展望。③SLE の難治性病態の解析とその克服。④抗リン脂質抗体測定法の標準化。⑤抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生機構ならびに血管病変発現機構の解析。⑥多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の病態解析。⑦PM/DM に合併する間質性肺炎の発症機序ならびに治療の検討。⑧シェーグレン症候群の組織障害機構の解析。⑨自己免疫疾患の新しい治療薬の検討。

以下の項目を全体研究として行った。

①膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を開始した。②抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)の作製を引き続き行った。③SLE の疾患感受性遺伝子解析を、厚生労働科学研究費補助金による ヒトゲノム・再生医療等研究事業「SLE を中心とした自己免疫疾患感受性遺伝子の解明班(笹月健彦主任研究者)」との共同研究事業として開始した。

**A.研究目的**

本研究の目的は各々の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

**B.研究方法**

自己免疫疾患の中から研究調査の対象を全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)、Sjogren 症候群(SjS)の4疾患に絞り、各々の疾患における免疫系の異常の特

徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指すために以下の研究を行った。

1. HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常に関する研究。
2. PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症の解析。
3. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞による CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析。
4. 免疫バランスの自己免疫病における意義。



5. 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究
6. クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究。
7. 全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究。
8. 抗リン脂質抗体産生を誘導する $\beta$  2-グリコプロテイン I 分子修飾に関する研究。
9. 抗リン脂質抗体症候群の診断法:酸化 LDL $\cdot\beta$  2-グリコプロテイン I 複合体(自己抗原)とそれらの免疫複合体の測定意義。
10. 抗リン脂質抗体症候群に対する rituximab(リツキサン)の有用性に関する研究
11. 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトロンビン抗体の測定意義について。
12. 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討。
13. Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の 140kDa 蛋白を認識する自己抗体に関する研究。
14. 実験的自己免疫性筋炎(EAM)の作製と免疫学的解析に関する研究。
15. IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発に関する研究。
16. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死における Fas および CD40 の役割に関する研究。
17. シェーグレン症候群の発症および進展機序に関する研究。
18. *C1q* 遺伝子多型が C1q 産生ならびにループス腎炎におよぼす影響。
19. SLE をはじめとするリウマチ性疾患感受性遺伝子に関する研究。
20. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御に関する研究。
21. 膠原病における IL-15 の検討:難治性病態との関連
22. 臓器障害性抗 DNA 抗体の惹起因子の研究。
23. 全身性自己免疫疾患における自己抗体の網羅的検索に関する研究。
24. スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究。

### C.研究結果と考察

自己免疫疾患を発症する env-pX ラット(ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット)について、末梢 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の量的ならびに質的異常を検討しこの細胞では CTLA-4 や Foxp3 の発現低下があり、これらの分子異常と細胞機能の異常が関連している可能性が示唆された。

PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、活性化した T、B、及びミエロイド系細胞に発現が認められる。PD-1 欠損マウスを作製し、PD-1 欠損マウスが C57BL/6 系統においては自己免疫性の糸球体腎炎および関節炎を、BALB/c 系統においては自己免疫性の拡張型心筋症を発症することを示した。拡張型心筋症は原因不明の致死の疾患であり、現段階では極めて治療の困難な疾患である。拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスが産生

する心臓特異的抗体の抗原を精製・同定し、心臓型トロポニン I であることを明かした。また、心臓型トロポニン I に対するモノクローナル抗体を作製、野生型マウスに投与することにより、拡張型心筋症を惹起することに成功した。この結果は、心臓抗原に対する自己抗体により拡張型心筋症が発症しうることを初めて示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、新たな治療法確立への具体案を示した。

ヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup>T 細胞) の内、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞 (抑制性 T 細胞; Treg) が免疫系において抑制的な役割を果たすことが明らかとなり、自己免疫疾患においてこの抑制性 T 細胞の果たす役割が注目されている。我々はこの抑制機序の少なくとも一部が抗原提示細胞の機能抑制であることを見出し、更にこれまでアナジーにあるとされてきた抑制性 T 細胞が他の活性化 T 細胞依存性に増殖することから、新たな免疫系のネガティブフィードバックシステムを提唱した。

免疫バランス制御に関与する免疫担当細胞の性状や調節機構を明確にするとともに、それらの自己免疫病発症における意義を明確にすることを試みた。その結果、NKT, NK, T 細胞活性化における DC の役割を追求して自己免疫病発症感受性の異なる BALB/c と C57BL/6 マウスにおいては NKT 活性化における DC の機能が遺伝的に異なることを発見した、さらに、BALB/c や C57BL/6 マウスにおいては、CD4<sup>+</sup>T 細胞や、CD8<sup>+</sup>T 細胞の獲得性免疫に関与する細胞群のうち、いわゆるメモリータイプ T 細胞の機能に遺伝的差異があることも明確にした。

全身性エリテマトーデス (SLE) における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプターと CD3 複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の

60% に、TCR と 鎖の蛋白合成低下が、一部の症例には異常スプライシングを伴ったメッセージ異常が見い出された。TCR と 鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR と 鎖 mRNA ヴァリエントがどのように関与しているかは不明である。その分子機序を *in vitro* 翻訳システムで検証すると共に、これらヴァリエント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立し、それを用いてこのヴァリエント TCR と 鎖が、細胞内でどのような機能異常と関連しているのかを明らかにした。

近年、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることが明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、ヒトの活性化 T 細胞上にも発現しているが、その機能については不明であった。本研究では、活性化された CD4 陽性 T 細胞に発現している HLA-DR 分子を介するシグナルが、少なくとも Rap1 と p27<sup>Kip1</sup> の発現増強を通して、T 細胞のアナジー誘導に貢献していることを明らかにした。

自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40L トランスジェニックマウスにおける Bリンパ球自己トレランス異常と産生される自己抗体の性状について検索した。その結果、中枢リンパ組織でのトレランス機構と末梢リンパ組織でのトレランス機構で標的となる自己抗体の性状が異なることが明らかとなった。この結果から、自己免疫疾患で産生される自己抗体の性状から、どのような自己トレランス機構に異常があるのかを診断できる可能性が示唆された。

抗リン脂質抗体症候群 (APS) における抗  $\beta$  2GPI 抗体産生は正常の T 細胞レパトワに存在する  $\beta$  2GPI 反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化による。 $\beta$  2GPI 反応性 T 細胞は DRB4\*0103 拘束性にリン脂質結合ドメインを含むエピトープ (p276-290) を認識する。

ただし、p276-290は抗原提示細胞(APC)における native な $\beta$  2GPI からのプロセッシングでは作られないことから、何らかの要因による APC での p276-290 の提示が $\beta$  2GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して抗リン脂質抗体産生を誘導している可能性がある。本年度は APS 患者由来の $\beta$  2GPI 反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞クローン株を用いて APC における p276-290 の発現機構を追究した。

酸化 LDL- $\beta$  2-GPI・間での複合体形成の機序についてさらに検討した結果、 $\beta$  2-GPI と酸化 LDL が静電的な相互作用で結合した後、Schiff base adduct などによる安定な共有結合が現れることが明らかとなった。患者血中には、この種の安定型 $\beta$  2-GPI・酸化 LDL 複合体が存在する。さらに、酸化 LDL・ $\beta$  2-GPI 複合体に対する自己抗体の測定法および血中酸化 LDL の測定法を確立し APS における臨床意義について解析を行った。その結果は、APS の臨床症状(動・静脈血栓など)と、血中酸化 LDL および酸化 LDL・ $\beta$  2-GPI 複合体に対する自己抗体、もしくは、それらの免疫複合体の出現との間に有意な関連があることが明らかになった。

非ホジキンリンパ腫および治療抵抗性特発性血小板減少性紫斑病に合併した抗リン脂質抗体症候群 3 症例に対し CD20 に対するモノクローナルキメラ抗体である rituximab を投与し、その有用性を検討した。全症例で投与 1 ヶ月後には抗カルジオリピン抗体は陰性となり、上昇していたプロトロンビンプラゲメント(F<sub>1+2</sub>)も正常値となった。重篤な副作用は認められず、本症候群に対する新規治療法となりうる可能性が示唆された。

抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、APS の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。しかし抗プロトロンビン抗体は測定法によって結果がまったく異なっている。これまでの検討から、ホスファチジ

ルセリンを固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(APS/PT)が APS のマーカーとなりうることがわかった。APT/PS は APS の臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつ可能性が示された。また、LA の補助診断として有用である。モノクローナル APS/PT をもちいた半定量 LA をおこなうと著しく高い感度で APS のスクリーニングが可能であることも明らかになった。

膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を開始した。症例検討によりその有用性が示唆され、従来予後不良とされた膠原病に合併する難治性間質性肺炎の新たな治療法が開発される可能性がある。今後前向き検索的・検証的治験を企画・実行し、更なる検討を進めていく予定である。

多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において間質性肺炎(Interstitial Lung Diseases, ILD)は、重要な予後因子であるが、特に DM の中で、筋炎症状に乏しい症例(Amyopathic DM, ADM)に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia, AIP)を合併することが知られている。そのような症例では、抗 US 抗体が特異的に検出された。

多発性筋炎の優れた実験モデル動物作製の報告は少ないが、近年、ミオシン分画中に含まれる C-protein に強い筋炎惹起性があることが報告され、新しい筋炎モデルとして注目を集めている。本研究では、Lewis ラットへの C-protein の免疫にて、明らかな実験的自己免疫性筋炎(experimental autoimmune myositis, EAM)を誘導できることが確認された。筋炎組織には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、およびマクロファージが浸潤していた。また、浸潤単核細胞ある

いは血管内皮細胞は、MCP-1 とそのレセプター、IFN- $\gamma$ 、ICAM-1、および integrin  $\alpha$  4 を発現していた。これらの分子が、本筋炎モデルにおける病態形成に関与していると考えられた。

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。ステロイドや免疫抑制剤に抵抗性を示す症例があり、新しい治療法の開発が必要とされている。リンパ球性間質性肺炎(LIP)を合併した26例のキャスルマン病患者に対しヒト化抗IL-6レセプター抗体(MRA)を使用し、高分解能CT(HRCT)を用いて検討した。MRAは、炎症性細胞浸潤に基づくと考えられるHRCT上での小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚、スリガラス影を有意に改善した。一方、不可逆性変化と考えられる浸潤影、嚢胞は改善しなかった。したがって、IL-6阻害治療は炎症細胞浸潤が主体のLIPの治療に有効であることが検証された。

シェーグレン症候群(以下SS)唾液腺においては、リンパ球からなる細胞浸潤が生じ、腺細胞死、腺機能廃絶へと至る。上皮細胞死におけるFasおよびCD40の役割について分子学的検討を行った。その結果、SS唾液腺においては浸潤リンパ球から産生されるIFN $\gamma$ により活性化された唾液腺上皮細胞がFasおよびCD40を発現し、その状態でFasLおよびCD40Lを発現する活性化T細胞より刺激を受けてアポトーシスにより死に至るメカニズムが示唆された。

シェーグレン症候群(SS)の発症および進展機序について、Toll-like receptors (TLRs)との関連性を検討した。SS口唇小唾液腺組織の腺房細胞、導管上皮細胞、浸潤単核球にはTLR2、TLR4およびMyD88の発現が検出された。SS唾液腺細胞に発現するTLRsはサイトカイン産生や副刺激分子発現を介し、SS唾液腺組織の慢性炎症

反応を増強することが示唆された。

SLEは多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患で、病因解明には遺伝要因の解明が必須である。今回我々はSLE自然発症New Zealandマウス系を用いて、ループス腎炎感受性遺伝子のQLT解析を行った。その結果、第4染色体上にコードされるC1q遺伝子のNZB型多型が、C1q産生能の低下を来とし、これがループス腎炎発症の一感受性要因として働いている可能性を見出した。

全身性エリテマトーデス(SLE)および関節リウマチ(RA)を中心とするリウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子を見出す目的で、本年度は、LIR1(ILT2, LILRB1), BAFF-R遺伝子の多型スクリーニングと関連解析を施行し、LIR1の細胞外領域多型がHLA-DRB1 shared epitope陰性の関節リウマチ(RA)と有意な関連を示し、細胞内領域多型がSLEと関連する傾向を示すこと、BLySとBAFF-Rの遺伝子型の組み合わせがRAと関連することを見出した。さらに、以前SLEとの関連を報告したHLA-DRB1およびFc $\gamma$ 受容体IIb遺伝子の関連をタイ人集団において検討し、それぞれDRB1\*1502, FCGR2B-232Tおよび3B-NA2の関連が検出された。これらの知見と日本人集団との比較は、疾患感受性遺伝子をさらなる限局化や、疾患との関連の機序の検討のうえで、有用な情報を与えると考えられる。

全身性エリテマトーデスSLEの治療に於いては、ステロイド薬や免疫抑制薬を用いた薬物療法を主体とするが、これらの薬剤に対する抵抗性獲得とその克服は、重要な問題点である。疾患活動性が高いSLEの活性化リンパ球では既にP糖蛋白質が発現し、治療不応性を齎す事が示された。即ち、リンパ球上のP糖蛋白質発現の評価は、薬剤耐性や不応性の臨床的指標として治療方針決定において有用であり、P糖蛋白質特

異的拮抗薬による不応性解除によるテーラード医療の実践の可能性が示唆された。

膠原病で血中IL-15を測定し、臨床所見との関連を検討した。膠原病の中では、結節性多発動脈炎、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎で高値で、血管炎・間質性肺炎(IP)・血球貪食症候群といった難治性病態と関連していた。IL-15高値の症例は予後が不良で、剖検ではDiffuse Alveolar Damage等の組織破壊が認められ、モデルマウスへのIL-15投与実験でも類似の傾向を認めた。IL-15増加の頻度の高いIPを併発した症例ではT細胞のIL-2R/IL-15R $\gamma$ 鎖の発現が高い傾向を示し、IL-15によるT細胞の異常活性化の可能性が示唆された。

臓器障害性抗DNA抗体を惹起する因子の研究はSLE発症の解明、原因療法開発に直結する可能性を持つ。本邦のWHO IV型ループス腎炎に共通して発現するイディオタイプを有するヒトモノクロナル抗DNA抗体O-81をプローブとして、SLE例cDNAライブラリーの発現系を用いて、O-81と結合しうる因子(蛋白)を追求した。

炎症性筋疾患、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患ではさまざまな自己抗体が報告されているがその網羅的包括的な把握は十分でない。そのため、病因病態に関与する自己抗体・自己抗原を網羅的検索が必要である。プロテオミクスの手法により炎症性筋疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)、ベーチェット病などにおける自己抗体の網羅的な検索を試みた。これにより複数の自己抗原が同時に検出され、また、mass fingerprinting法により、cofilinなどの新規自己抗原を同定した。

スタチン類の多面的効果としての抗リウマチ作用の機序をアポトーシス誘導作用の観点から、今回はin vivoでのT細胞とin vitroで

の培養滑膜細胞に対するアポトーシス誘導作用の有無を解析すること目的とした。脂溶性スタチンのフルバスタチンはin vivoで正常マウス胸腺細胞にアポトーシス誘導能を示し、メバロン酸経路依存性であった。また培養滑膜細胞に対してもアポトーシス誘導能を示し、protein geranylgeranylation阻害に基づくことが強く示唆された。

## E. 結論

1. CD25+CD4+T 細胞をはじめとする調節性T細胞やT細胞機能異常として自己免疫疾患をとらえることの重要性が明らかになった。
2. 免疫調整分子としてのPD-1の重要性が明らかになった。
3. B細胞の機能分子異常が自己抗体産生に関与することの重要性が明らかになった。
4. 抗リン脂質抗体症候群における対応抗原の解析が進展した。
5. 抗リン脂質抗体症候群の新しい診断法が詳細に検討され、実用化のめどが立った。
6. 抗リン脂質抗体症候群の治療指針がほぼ出来上がった。
7. PM/DMの間質性肺炎に対する新しい治療法の可能性が示された。
8. SLEの遺伝子異常の解析が進展した。
9. SLEの難治性病態の解析が進展した。
10. SLEにおけるステロイド抵抗性と多剤耐性遺伝子の関係が明確になった。

11. SJS の組織障害の機序の解析が進展した。
12. リツキサンのタクロリムス、IL-6受容体抗体、スタチン等、既存薬で自己免疫疾患の治療に使用可能なものが明らかになってきた。

### (3) 分担研究報告書

## HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の 機能異常に関する研究

石津 明洋（北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野）

### 研究要旨

自己免疫疾患を発症する env-pX ラット（ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット）について、末梢 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の量的ならびに質的異常を検討した。疾患発症前の env-pX ラットと同系正常ラットでは末梢における本細胞の数に有意な差は認めなかったが、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞には免疫反応抑制機能の障害やアナジー状態の破綻が認められた。env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では CTLA-4 や Foxp3 の発現低下があり、これらの分子異常と細胞機能の異常が関連している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット（env-pX ラット）は、抗核抗体や抗 DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体を産生し、関節炎や血管炎、血栓症、唾液腺炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎など様々な collagen vascular disease を発症するヒト自己免疫疾患のプロトタイプモデルである。これまでに、本ラットにおける末梢リンパ球や胸腺の異常を示してきた。本研究では、マウスで免疫反応抑制機能をもつことが知られている CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞について、env-pX ラットでの量的ならびに質的異常を検討した。

### B. 研究方法

6～8 週齢の疾患未発症の env-pX ラットおよび同系正常ラット（WKAH ラット）の脾細胞中の CD25<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、これらのラットの脾臓から magnetic cell sorting により CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を抽出し、抗 CD3 抗体による

正常リンパ球刺激反応系に添加して、増殖反応抑制機能を比較検討した。CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞単独での増殖性や抗 CD3 抗体による反応性についても比較した。さらに、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能発現に係わると考えられる各種分子群について、フローサイトメトリーや定量的リアルタイム RT-PCR の手法を用いて env-pX ラットと同系正常ラット間で比較検討を行った。

### C. 研究結果

env-pX ラットと WKAH ラットでは、全脾細胞数ならびに CD4<sup>+</sup> T 細胞数は同等で、CD4<sup>+</sup> T 細胞に占める CD25<sup>+</sup>細胞の比率にも有意差は認めなかった。

一方、WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞は、抗 CD3 抗体による CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖反応を細胞数依存的に抑制したのに対し、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞ではその抑制機能が観察されなかった。また WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞はアナジーの状態にあったのに対し、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞



は自律性の増殖を示し、抗 CD3 抗体による刺激に対して有意な増殖反応を示した。

env-pX ラットと WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、T 細胞レセプターの発現量や CD45RC、CD122 (IL-2 レセプターβ鎖)、CD28、CD80/86 の発現量に違いは認められなかった。膜結合型 TGF-β の発現は、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞で高い傾向にあった。正常では CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に特徴的とされる CTLA-4 および Foxp3 の発現は env-pX ラットでは低く、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞と同程度の発現しか認められなかった。

#### D. 考察

疾患発症前の env-pX ラットでは、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に量的異常はないものの、同細胞のアナジー状態が破綻しており、免疫反応抑制機能に障害があることが明らかとなった。ラットナイーブ T 細胞の指標とされる CD45RC は、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞においても正常ラットと同様に発現しており、また、脾細胞に占める本細胞の比率に正常ラットとの違いは認められないことから、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞が、未発見の疾患状態における活性化を受けた T 細胞群である可能性は低いと考えられる。

CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞が免疫反応抑制機能を発揮する分子機構については未だ明らかとはなっていない。今回の検討から、T 細胞レセプターや CD122、CD28、CD80/86 が env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常に関わっているとは考えにくい。また、免疫反応抑制作用を発揮することが知られる膜結合型 TGF-β の発現も env-pX ラットでは予想に反し高かったため、この系では TGF-β の関与も否定的である。

一方、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、正常では高発現である CTLA-4 の発現が CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞と同等のレベルまで低下していた。さらに、CTLA-4 を転写段階で制御すると考えられている Foxp3 についてもその発

現低下していた。マウスでは CTLA-4 をブロックすることにより CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の抑制機能が失われることや、Foxp3 を遺伝子導入することで CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に抑制機能を付与することができることが知られている。CTLA-4 および Foxp3 の発現低下が env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常に関連している可能性が考えられる。今後は、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常がどのような分子機構で生じているのかについて、導入遺伝子との関連性を含め、さらに詳細な解析を行う予定である。

#### E. 結論

自己免疫疾患を発症する env-pX ラットにおいて、免疫反応抑制能をもつ CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に疾患発症前から機能異常が認められた。env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では CTLA-4 や Foxp3 の発現低下があり、これらの分子異常と細胞機能の異常が関連している可能性が示唆された。env-pX ラットは、ヒト自己免疫疾患患者における CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能的役割を理解するうえで、有用な動物モデルと考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fugo K, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Sugaya T, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Suzuki A, Shibata M, Takahashi T, Yoshiki T. The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T cell leukemia virus type I. *Am J Pathol* 161: 755-761, 2002.
2. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T. Clonotypic analysis of T

cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. *Exp Mol Pathol* 72: 56-61, 2002.

3. Ogawa Y, Ishizu A, Ishikura H, Yoshiki T. Elution of IgA from the kidney tissue exhibiting a glomerular IgA deposition and analysis of the antibody specificity. *Pathobiology* 70: 98-102, 2002.
4. Higuchi M, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Fugo K, Tsuji M, Abe A, Sugaya T, Suzuki A, Takahashi T, Koike T, Yoshiki T. Functional alteration of peripheral CD25+CD4+ immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 20: 43-49, 2003.
5. 石津明洋, 吉木 敬: ウイルス遺伝子導入ラットとリウマチ性病態. *リウマチ科* 27: 213-217, 2002.
6. 辻 宗啓, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬: モデル動物からみたリウマチ性疾患. *リウマチ科* 27 (Suppl.), 101-106, 2002.
7. 石津明洋, 吉木 敬: HAM/TSP のラットモデル. 別冊・医学のあゆみ (Ver. 2) 331-335, 2002.

## 2. 学会発表

1. 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける関節炎発症機序に関する検討. 第27回北海道リウマチ研究会, 2002. 2.16, 札幌, 第27回北海道リウマチ研究会プログラム・抄録 p16
2. 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症機序に関する検討. 第91回日本病理学会総会, 2002. 3.26-28, 横浜, 日本病理学会会誌 91 (1): 201.
3. 大塚紀幸, 田中 敏, 山本友希代, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬: ERV3 トランス

ジェニックラットにおけるヒトレトロウイルス外被蛋白発現と免疫機能の解析. 第91回日本病理学会総会, 2002. 3.26-28, 横浜, 日本病理学会会誌 91 (1): 201.

4. 辻 隆裕, 菊地和徳, 土川貴裕, 宮武由甲子, 石津明洋, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I pXトランスジェニックラットに発生した腫瘍における遺伝子発現の検討. 第91回日本病理学会総会, 2002. 3.26-28, 横浜, 日本病理学会会誌 91 (1): 224.
5. 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける関節炎発症機序に関する検討. 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2002.4.22-24, 神戸, *リウマチ* 42 (2): 386.
6. 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める関節炎の発症ならびに持続機序に関する検討. 第35回北海道病理談話会, 2002.8.31, 旭川, 第82回北海道医学大会プログラム(病理系分科会), p24
7. 辻 隆裕, 池田 仁, 石津明洋, 高橋利幸, 吉木 敬: HTLV-I pXトランスジェニックラット胸腺腫の悪性化とそれに関わる遺伝子発現の解析. 第77回北海道癌談話会, 2002.9.7, 札幌, 第82回北海道医学大会プログラム(腫瘍系分科会), p17
8. 辻 隆裕, 池田 仁, 菊地和徳, 土川貴裕, 富居一範, 石津明洋, 高橋利幸, 吉木 敬: 異所性移植によるHTLV-I pXトランスジェニックラット胸腺腫の悪性化とその解析. 第61回日本癌学会総会, 東京, 2002.10.1-3, *Jpn J Cancer Res* 93 (Suppl.): 58, 2002.
9. 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める関節炎の発症ならび

に持続機序に関する検討 第32回日本  
免疫学会総会・学術集会、東京、  
2002.12.4-6、日本免疫学会総会・学術集  
会記録、32: 296.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

## PD-1 欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症に関する研究

篠原隆司(京都大学大学院医学研究科・分子生物学)

### 研究要旨

ヒトの自己免疫疾患を研究する上において、遺伝子欠損マウスは非常に有用なモデルになりうる。我々が単離した PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、活性化した T、B、及びミエロイド系細胞に発現が認められる。PD-1 は、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 をリクルートすることにより抗原受容体刺激を抑制し、免疫反応を負に制御している。我々はこれまでに、PD-1 欠損マウスを作製し、PD-1 欠損マウスが C57BL/6 系統においては自己免疫性の糸球体腎炎および関節炎を、BALB/c 系統においては自己免疫性の拡張型心筋症を発症することを報告してきた。拡張型心筋症は原因不明の致死の疾患であり、現段階では極めて治療の困難な疾患である。今回我々は、拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスが産生する心臓特異的抗体の抗原を精製・同定し、心臓型トロポニン I であることを明かした。また、心臓型トロポニン I に対するモノクローナル抗体を作製、野生型マウスに投与することにより、拡張型心筋症を惹起することに成功した。この結果は、心臓抗原に対する自己抗体により拡張型心筋症が発症しうることを初めて示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、新たな治療法確立への具体案を示した。

### A.研究目的

PD-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり、活性化した T、B、及びミエロイド系細胞に発現が認められる。PD-1 は、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 をリクルートすることにより抗原受容体刺激を抑制し、免疫反応を負に制御している。我々はこれまでに、PD-1 欠損マウスを作製し、PD-1 欠損マウスが C57BL/6 系統においては自己免疫性の糸球体腎炎および関節炎を、BALB/c 系統においては自己免疫性の拡張型心筋症を発症することを報告してきた。

拡張型心筋症は原因不明の致死の疾患であり、現段階では極めて治療の困難な疾患である。拡張型心筋症を発症した全ての PD-1 欠損マウスが、約 30kD の心臓特異的抗原に対する自己抗体を産生することから、また、同じ抗原特異性をも

った自己抗体の沈着が拡張した心臓に認められたことから、この自己抗体が拡張型心筋症を惹起していることが予測された。

ヒト拡張型心筋症における心臓抗原に対する自己抗体の産生についてはこれまでに多くの報告がなされてきたが、それらの病原性については分かっていなかった。特にミオシンを免疫することにより誘導される心筋炎及び末期の心拡張については、自己抗体の関与は否定されており、自己抗体の直接作用による心拡張作用については否定的であった。そこで、PD-1 欠損マウスが産生する心臓特異的抗体の抗原を精製・同定することにより、自己免疫性拡張型心筋症の発症機序を解析した。

### B.研究方法

拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウス脾